

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

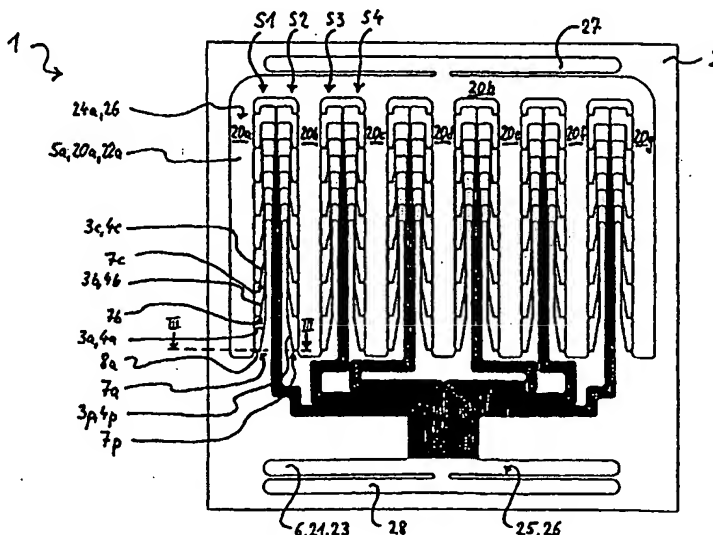
(51) Internationale Patentklassifikation 7 : G01N 27/447		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/58721
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	5. Oktober 2000 (05.10.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/02510 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. März 2000 (22.03.00) (30) Prioritätsdaten: 199 14 354.4 30. März 1999 (30.03.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR MIKROTECHNIK MAINZ GMBH [DE/DE]; Carl-Zeiss-Strasse 18-20, D-55129 Mainz (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HARTMANN, Hans-Joachim [DE/DE]; Kronprinzenstrasse 18, D-65185 Wiesbaden (DE). KONRAD, Renate [DE/DE]; Hauptstrasse 127b, D-65843 Sulzbach (DE). SCHIEWE, Jörg [DE/DE]; Bodenheimer Strasse 20, D-55129 Mainz (DE). POMMERSHEIM, Rainer [DE/DE]; Kupferbergterrasse 21, D-55116 Mainz (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: INSTITUT FÜR MIKROTECHNIK MAINZ GMBH; Carl-Zeiss-Strasse 18-20, D-55129 Mainz (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	

(54) Title: ELECTROPHORESIS CHIP AND DEVICE FOR OPERATING AN ELECTROPHORESIS CHIP

(54) Bezeichnung: ELEKTROPHORESECHIP SOWIE GERÄT ZUM BETREIBEN EINES ELEKTROPHORESECHIPS

(57) Abstract

The invention relates to an electrophoresis chip and a device for operating such a chip. With known electrophoresis chips integration of the electrodes is virtually impossible owing to the relatively large number of reservoirs to be filled and contacted. The aim of the invention is to provide an electrophoresis chip (1) which has sample application zones which can be positioned in the grid of titration plates but do not present the above disadvantages. To this end exactly one sample application area (7a, 7b, ...) is integrated into the beginning of each separation channel, formed by an expanded area of said separation channel (3a, 3b, ...) and via an intermediate channel (8a, 8b, ...) connected to a cathode (5a, 5b, ...). This configuration permits the integration of the electrodes (5a, 5b, ..., 6) in the form of electrode channels (20a, 20b, ..., 21) and the parallel application of samples.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Elektrophoresechip sowie Gerät zum Betreiben eines Elektrophoresechips

Die Erfindung betrifft einen Elektrophoresechip aus einem mit einer Deckplatte versehenen plattenförmigen Substrat mit Trennkanälen, die in dem Substrat als Nuten eingebracht sind, wobei am Anfang der Trennkanäle Kathoden und am Ende der Trennkanäle mindestens eine Anode vorgesehen sind, und mit matrixartig in Zeilen und Spalten angeordneten Probenauftragungsbereichen, an deren Stelle die Deckplatte Öffnungen aufweist. Weiterhin wird ein Gerät zum Betreiben mindestens eines Elektrophoresechips beschrieben.

In der Biotechnologie und Medizin werden für analytische und diagnostische Zwecke zunehmend miniaturisierte Systeme, sogenannte micro total analysis systems (μ TAS), eingesetzt. Solche Systeme ermöglichen eine gleichzeitige und schnelle Vorbehandlung, Umsetzung und/ oder Analyse einer großen Anzahl von Proben. Zur elektrophoretischen Auftrennung und Analyse von DNA-, RNA- oder Protein-Fragmenten oder anderen elektrisch geladenen Molekülen werden als miniaturisierte Systeme plattenförmige Bauteile mit kapillarartigen Nuten als Trennkanäle eingesetzt, die als Elektrophoresechip bezeichnet werden. Für die Herstellung solcher Bauteile werden Verfahren zur Mikrostrukturierung, beispielsweise von Silizium, Metallen, Glas oder Polymeren, eingesetzt. Insbesondere mittels Abformverfahren aus polymeren Werkstoffen erhaltene kostengünstige Analysesysteme haben den entscheidenden Vorteil, daß sie als Wegwerfsysteme nicht aufwendig gereinigt werden müssen und damit keine Kontaminationsprobleme auftreten.

P. C. Simpson et al. beschreiben in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 95, pp. 2256-2261, March 1998, Biophysics, unter anderem einen Elektrophoresechip zur elektrophoretischen Auftrennung von 96 Proben. Der Chip besteht aus einer Glasplatte, die 48 Trennkanäle als Nuten aufweist. Jeder Trennkanal ist mit einer auf dem Chip integrierten Probenzuführungseinheit verbunden, die die serielle Zuführung von 2 unterschiedlichen Proben ermöglicht, so daß mit 48 Trennkanälen 96 Proben aufgetrennt werden können. Die mikrostrukturierte

Glasplatte ist mit einer Polymerfolie abgedeckt, wobei unter anderem 96 Löcher in einer 8x12 Matrixanordnung die Probenaufgabe mit einem 8-fach Pipettierautomaten ermöglichen.

Die Probenzuführungseinheit bei Elektrophoresechips weist üblicherweise eine Kreuzstruktur auf, d. h. den Trennkanal kreuzt im rechten Winkel ein zwischen einem Abfallreservoir und einem Probenauftragungsbereich angeordneter Injektionskanal. Die Proben werden in den Bereich des Trennkanals durch Wanderung in einem zwischen dem Probenauftragungsbereich und dem Abfallreservoir angelegten elektrischen Feld gebracht.

Simpson et al. beschreiben an oben angegebener Stelle eine solche Probenzuführungseinheit mit Kreuzstruktur, wobei der den Trennkanal kreuzende Injektionskanal mit zwei Probenauftragungsbereichen verbunden und ein Abfallreservoir zwei Probenzuführungseinheiten zugeordnet ist. Zur Probenauftragung und Elektrodenzuführung sind $5/4N+7$ Löcher, d. h. für diesen 96-er Chip 127 Löcher vorzusehen. Als theoretisches Minimum wird eine Anzahl von $N+3$ notwendigen Löchern bei N Proben angegeben.

Die Trennkanäle sind derart zwischen Kathode und Anode angeordnet, daß sie eine gleiche Länge aufweisen. Zur Erhöhung des Volumens der einzelnen Pufferreservoirs in den Probenauftragungsbereichen und Abfallreservoirs wird eine in diesen Bereichen Löcher aufweisende Elastomerfolie einer Dicke von 1 mm aufgesetzt. Über diese Anordnung von mikrostrukturierter Glasplatte und Reservoir bildender Elastomerfolie befindet sich ein von einer Platine mit Leiterbahnen gehaltenes Elektrodenarray. Hierzu sind in der Platine Platin-Drähte befestigt, die in die Löcher der Reservoirs hineinragen.

Die Detektion der aufgetrennten Proben erfolgt optisch in einem Bereich vor der Anode, wo die Trennkanäle parallel zueinander verlaufen.

Um den Durchsatz zu verdoppeln, wird die Möglichkeit erwähnt, 96 einzelne Trennkanäle vorzusehen. Zur Erhöhung der Integrationsdichte auf einem Chip wird eine Auftragung von 4 Proben pro Trennkanal genannt.

In einem späteren Artikel beschreiben R. A. Mathies et al. in Proceedings of the Micro Total Analysis Systems '98 Workshop, held in Banff, Canada, 13-16 October 1998, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, neben dem zuvor ausgeführten Elektrophoresechip einen Chip mit 96 einzelnen Trennkanälen zur Auftrennung von 96 Proben. Hierdurch wird der Durchsatz bei gleichzeitiger Vermeidung von Querkontaminationen erhöht. Es wird genannt, daß hierbei ein entsprechendes Layout unter Beibehaltung der rechtwinkligen Ausgestaltung schwierig zu konfigurieren wäre. Daher wird eine radiale Konfiguration der Trennkanäle vorgeschlagen, wobei der Elektrophoresechip als kreisförmige Scheibe ausgebildet ist. An dem radial nach außen gelegenen Anfang je zwei benachbarter Trennkanäle ist eine Probenzuführungseinheit mit zwei Probenauftragungsbereichen und einer gemeinsamen Kathode und Abfallreservoir angeordnet. Die Anzahl der zu befüllenden und elektrisch zu kontaktierenden Reservoirs beträgt daher $2N+1$. Aufgrund der radialen Anordnung wird jedoch ein neuartiges Detektionssystem benötigt.

Wesentlicher Nachteil dieser bekannten Elektrophoresechips ist die Anzahl der zu befüllenden und zu kontaktierenden Reservoirs, die über die eigentliche Anzahl der Probenauftragungsbereiche hinausgeht. Damit verbunden ist eine aufwendige elektrische Kontaktierung und Ansteuerung. Eine Integration der Elektroden in den Elektrophoresechip ist bei dieser Ausgestaltung und unter der Voraussetzung, daß sich elektrische Leiterbahnen und Fluidkanäle nicht kreuzen, nicht ohne weiteres realisierbar.

Aufgrund des Platzbedarfs der Probenzuführungseinheiten mit Kreuzstruktur ist eine Anordnung der Probenauftragungsbereiche im Rastermaß der Titerplatten mit 384, 1536 oder mehr Vertiefungen kaum zu realisieren. Mit einer Anordnung in einem anderen Rastermaß fällt jedoch die Voraussetzung für eine schnelle, parallele Befüllung weg, so daß eine zeitaufwendige, serielle Übertragung der

Proben durchzuführen ist. Weiterhin wird das mit dieser zeitlichen Verzögerung einhergehende Austrocknen der extrem kleinen Probenvolumina zu einem großen Problem.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher, einen Elektrophoresechip der eingangs genannten Art bereitzustellen, dessen Probenauftragungsbereiche in dem Rastermaß einer Mikrotiterplatte mit einer großen Anzahl an Vertiefungen (wells), beispielsweise 384, 1536 oder größer, angeordnet werden können, und bei dem eine Integration der Elektroden in den Elektrophoresechip möglich ist. Darüber hinaus soll ein Gerät zum Betreiben mindestens eines Elektrophoresechips, das eine einfache Handhabung der Elektrophorechips als Einwegteile zuläßt, aufgezeigt werden.

Die beiden Aufgaben werden durch einen Elektrophoresechip gemäß den Merkmalen des Anspruchs 1 sowie durch ein Gerät gemäß den Merkmalen des Anspruchs 14 gelöst, wobei die abhängigen Ansprüche vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung betreffen.

Wesentliches Merkmal dieses Elektrophoresechips ist der genau eine in den Anfang jedes Trennkanals integrierte Probenauftragungsbereich. Der Probenauftragungsbereich ist von einem aufgeweiteten Bereich des Trennkanals gebildet und über einen Zwischenkanal mit einer Kathode verbunden. Damit weist dieser Elektrophoresechip nicht die bei bekannten Elektrophoresechips verwendeten Probenzuführungseinheiten mit Kreuzstruktur auf.

Bei üblicherweise verwendeten Probenzuführungseinheiten mit kreuzartiger Struktur werden Probenmengen im Bereich von 1 µl bis 100 µl aufgetragen, was durch Pipettieren erfolgt. Durch eine Wanderung der Probe im elektrischen Feld zwischen dem Probenauftragungsort und dem Abfallreservoir wird eine ausreichend kleine Menge hiervon in den Bereich des Trennkanals gebracht.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß zur Erzielung guter Trennergebnisse eine Probe ausreichend kleiner Menge auch direkt in einen zu einem Probenauftragungsbereich aufgeweiteten Trennkanal eingebracht werden kann. Die bisher verwendeten Probenzuführungseinheiten mit jeweils mindestens zwei Reservoirs können hierdurch eingespart werden. Damit entfallen auch die für die Probenzuführung erforderlichen Elektroden sowie die Abfallreservoirs. Damit reduziert sich die Anzahl der Öffnungen auf N Probenauftragungsbereiche, die zudem nicht elektrisch kontaktiert zu werden brauchen. Dies ermöglicht zum einen, die für die eigentliche Trennung erforderlichen Elektroden auf dem Elektrophoresechip zu integrieren. Zum anderen wird durch die hierdurch erreichte Platzeinsparung die Möglichkeit geschaffen, eine noch höhere Dichte der Probenauftragungsbereiche zu erreichen, und damit auch eine Anordnung entsprechend dem Rastermaß einer Titerplatte mit 384, 1536 oder noch höheren Anzahl von Wells zu ermöglichen. Gerade diese Anordnung im gleichen Rastermaß ermöglicht eine parallele und damit ausreichend schnelle Übertragung von Proben aus einer Titerplatte auf den Elektrophoresechip.

Von weiterem wichtigen Vorteil ist die Tatsache, daß noch kleinere Probenmengen als bisher für eine elektrophoretische Trennung in einem Elektrophoresechip ausreichend sind. So sind bei etwa gleichen Probenkonzentrationen Volumina kleiner gleich 1 µl, insbesondere kleiner gleich 50 nl, ganz besonders in einem Bereich zwischen 1 nl und 10 pl, als Probenmengen für gute Trennergebnisse mit dem erfindungsgemäßen Elektrophoresechip ausreichend.

Daher kann die Auftragung der Proben dahingehend vereinfacht werden, daß keine Pipetten, deren Volumina nicht beliebig verkleinerbar sind, mehr erforderlich sind. Vielmehr reichen Mengen aus, die durch Adsorption an einer kleinen Struktur, beispielsweise einem dünnen Drahtende, angelagert und durch Diffusion wieder abgegeben werden können. Hierzu wird etwa ein Ende eines Metalldrahtes, beispielsweise eines Durchmessers von 50 µm bis 150 µm, in die Probe eingetaucht, etwa in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte,

und anschließend in den Probenauftragungsbereich im Trennkanal des Elektrophoresechips eingebracht. Es konnte gezeigt werden, daß die bei einer Probenkonzentration von 2,5 fmol/ μ l bis 250 fmol/ μ l an Einzelstrang-DNA oder/ und Doppelstrang-DNA an einem Ende eines Drahtes mit einem Durchmesser von 75 μ m adsorbierte und durch Diffusion wieder freigesetzte Menge für eine elektrophoretische Trennung ausreicht. Bei noch kleineren Probenkonzentrationen kann die adsorbierte Menge durch Anlegen einer elektrischen Spannung an das verwendete Drahtende erhöht werden. Ebenso kann bei der Probenauftragung die Probe effizient im elektrischen Feld, wobei das Drahtende als Elektrode dient, wieder abgegeben werden. Solche Systeme sind auch einfach zu parallelisieren, so daß eine ganze Spalte oder Matrix von Proben gleichzeitig übertragen werden kann. Es kommen jedoch auch andere Verfahren zur Auftragung von Proben in kleinsten Mengen, beispielsweise mit Piezoaktoren vergleichbar mit Tintenstrahldrucksystemen, in Frage.

Zur Verdeutlichung und zum einfacheren Verständnis werden in der Beschreibung und in den Ansprüchen statt der allgemeinen Begriffe Elektrode und Gegenelektrode die speziellen Begriffe Kathode und Anode verwendet. Selbstverständlich kommt, in Abhängigkeit von der Art der aufzutrennenden Probe, auch eine umgekehrte Belegung als Anode und Kathode in Frage. Die Erfindung umfaßt somit jede beliebige Belegung der Elektroden und Gegenelektroden.

Die Kathoden und die Anode können Bestandteil mindestens einer separaten Einheit sein, die mit dem Elektrophoresechip verbunden wird.

Nach einer vorteilhaften Ausführungsform sind Kathoden und die Anode jedoch in dem Substrat integriert. Dies vereinfacht den Aufbau und die Handhabung des Elektrophoresechips dahingehend erheblich, daß keine zusätzliche die Elektroden aufweisende Einheit, beispielsweise eine Platine mit Stiften als Elektroden, über dem Elektrophoresechip anzuordnen und zu kontaktieren ist. Durch den Wegfall der Probenzuführungseinheiten mit den Injektionskanälen entfallen die damit verbundenen Elektroden zur Probenzuführung. Die verbleibenden, für die elektrophoretische Trennung erforderlichen Elektroden

können damit auf dem Chip integriert werden. Diese können auf der Oberseite, der Unterseite oder in dem Chipmaterial selbst angebracht sein. Vorteilhaft sind die Kathoden und die Anode so angeordnet, daß in allen Trennkanälen das gleiche elektrische Feld vorherrscht.

Bevorzugt sind die Kathoden und/ oder die Anode als Kathodenkanäle bzw. Anodenkanal ausgebildet. Diese Kanäle sind als Nuten in dem plattenförmigen Substrat eingebracht. Die Böden dieser Nuten weisen mindestens eine Schicht eines elektrisch leitfähigen Materials auf. Die mit den Probenauftragungsbereichen verbundenen Zwischenkanäle münden in Kathodenkanäle ein, während die mit den Probenauftragungsbereichen beginnenden Trennkanäle in den Anodenkanal einmünden.

Durch die Ausgestaltung der Kathoden und Anoden als Kanäle wird ein im Vergleich zu den bekannten Lösungen großes Reservoirvolumen für Pufferlösungen in der Ebene des Elektrophoresechips geschaffen. Damit ist eine Vergrößerung der Reservoirs über die Ebene des Chips hinaus, beispielsweise durch Aufsetzen von mit Pufferlösung gefüllten Pipettenspitzen oder einer dicken mit Löchern für das Pufferreservoir versehenen Elastomerfolie (P. C. Simpson, a. a. O.), nicht notwendig.

Vorteilhaft ist die Schicht eines elektrisch leitfähigen Materials mindestens eine Metallschicht, insbesondere Goldschicht. Hierzu ist das Metall, gegebenenfalls mit einer dazwischenliegenden Haftschrift, auf die Nutenböden aufgedampft. Solche Schichten, vorteilhaft sind Dicken von 10 nm bis 200 nm, können preiswert mit Beschichtungsverfahren, wie Sputtern oder Aufdampfen, aufgebracht werden. Um eine Beschichtung nur der Nutenböden zu erreichen, sind andere Bereiche des Chips vorteilhaft mit einer Maske abgedeckt.

Bevorzugt sind die Kathodenkanäle elektrisch und fluidisch zusammenhängend ausgebildet. Solch eine fluidisch zusammenhängende Kanalstruktur erleichtert das Befüllen mit einer Pufferlösung oder einem Gel und vergrößert zudem das zur Verfügung stehende Reservoirvolumen. Dadurch, daß die Kathodenkanäle

elektrisch miteinander verbunden sind, kann eine einzige, nach außen führende elektrische Kontaktierung der Kathode ausreichend sein. Vorteilhaft sind die Böden dieser Kanalstruktur durchgehend mit mindestens einer elektrisch leitfähigen Schicht versehen.

Um solch eine zusammenhängende Struktur zu ermöglichen, sind die Kathodenkanäle vorteilhaft derart spaltenartig zwischen Spalten von Probenauftragungsbereichen angeordnet, daß jeweils zwei benachbarte Kathodenkanäle jeweils zwei Spalten von Probenauftragungsbereichen seitlich umgeben. Die so in Spalten angeordneten Kathodenkanäle sind oberhalb der obersten Zeile der Probenauftragungsbereiche durch einen quer verlaufenden Kathodenkanal miteinander verbunden.

Mit dieser Anordnung ist es möglich, unter Beibehaltung eines bei Titerplatten üblichen Rastermaßes der Probenauftragungsbereiche eine zusammenhängende Kathodenstruktur vorzusehen, wobei an allen Trennkanälen das gleiche elektrische Feld vorherrscht und der Chip nur einen elektrischen Anschluß für die Kathoden aufzuweisen braucht.

Vorteilhaft münden die Trennkanäle parallel zueinander in einen quer hierzu ausgerichteten Anodenkanal ein. Dieser Bereich dient vorteilhaft als Detektionsbereich. Für eine optische Detektion ist der Elektrophoresechip zumindest in diesem Bereich optisch transparent ausgestaltet.

Zur Vergrößerung des zur Verfügung stehenden Reservoirvolumens ist vorteilhaft parallel zum quer verlaufenden Kathodenkanal und/ oder parallel zum Anodenkanal ein Kanal als Pufferreservoir auf dem Chip angeordnet. Dieser ist zumindest in einem mittleren Bereich mit dem Kathodenkanal bzw. Anodenkanal verbunden. Der Boden des als Pufferreservoir dienenden Kanals kann ebenfalls elektrisch leitfähig beschichtet sein.

Um ein ausreichend großes Puffervolumen zur Verfügung zu stellen, weisen die Kathodenkanäle, der Anodenkanal und/ oder der als Pufferreservoir dienende

Kanal vorteilhaft eine Breite $> 200 \mu\text{m}$, besonders vorteilhaft von $500 \mu\text{m}$ bis 3 mm , auf. Damit weisen diese Kanäle eine deutlich größere Breite als die Trennkanäle auf, deren Breite und/ oder Tiefe vorteilhaft im Bereich von $0,1 \mu\text{m}$ bis $200 \mu\text{m}$, besonders vorteilhaft im Bereich von $0,5 \mu\text{m}$ bis $100 \mu\text{m}$, liegt.

Um für alle Proben gleiche Trennbedingungen vorliegen zu haben, weisen die Trennkanäle bevorzugt gleiche Längen auf. Hierzu ist eine mäanderartige Führung der Kanäle in Kurven oder Schleifen erforderlich. Um durch die Biegungen die Trennbedingungen nicht ungünstig zu beeinflussen, sind möglichst große Kurvenradien, vorteilhaft $> 200 \mu\text{m}$, insbesondere zwischen $300 \mu\text{m}$ und $700 \mu\text{m}$, vorzusehen. Vorteilhaft weist jeder Trennkanal die gleiche Anzahl an Rechts- und Linkskurven auf, um gleiche Trennbedingungen zu erzielen.

Jeder Trennkanal erstreckt sich zwischen dem Probenauftragungsbereich und der Anode. Der Probenauftragungsbereich ist durch einen aufgeweiteten Bereich des Trennkanals gebildet, wobei dieser Bereich vorteilhaft einen Durchmesser von $50 \mu\text{m}$ bis $500 \mu\text{m}$, insbesondere von $80 \mu\text{m}$ bis $300 \mu\text{m}$, aufweist. Die Tiefe des Probenauftragungsbereichs beträgt vorteilhaft $10 \mu\text{m}$ bis $300 \mu\text{m}$. Bevorzugt ist eine im wesentlichen gleiche Tiefe wie die der Trennkanäle, was eine deutliche Vereinfachung der Herstellung zur Folge hat.

Der die Probenauftragungsbereiche mit einer Kathode oder einem Kathodenkanal verbindende Zwischenkanal weist vorteilhaft eine Breite größer gleich der Breite des vom Probenauftragungsbereich wegführenden Trennkanals auf. Ebenso vorteilhaft ist die Breite kleiner gleich dem Durchmesser des Probenauftragungsbereichs gewählt. Hierdurch wird eine gute fluidische Verbindung mit dem Kathodenkanal gewährleistet, bei nur geringer Diffusion einer aufgetragenen Probe in den Zwischenkanal.

Bevorzugt sind Breiten des Zwischenkanals von $50 \mu\text{m}$ bis $400 \mu\text{m}$. Die Tiefe wird vorteilhaft gleich der Tiefe des Probenauftragungsbereichs, des Trennkanals und/ oder des Elektrodenkanals gewählt. Es ist denkbar, daß ein

Bereich des Bodens des Zwischenkanals eine metallische Beschichtung aufweist, die als Elektrode geschaltet ist. Hierzu kann die metallische Beschichtung sich vom Elektrodenkanal bis in den Zwischenkanal hinein erstrecken.

Zur Vermeidung eines Eintrocknens der Proben und des Puffers, zur Erzielung von Kapillarkräften in den Kanälen bei der Befüllung sowie zur Vermeidung von Kontaminationen weist der Elektrophoresechip eine Deckplatte auf, die zumindest im Bereich der Probenauftragungsbereiche Löcher als Durchgangsöffnungen hat.

Bevorzugt ist das plattenförmige Substrat mit den hineinstrukturierten Kanälen ein einstückiges, abformtechnisch hergestelltes Polymerteil. Ebenfalls bevorzugt ist die Deckplatte eine Polymerfolie, die entsprechende Löcher aufweist. Die Realisierung solcher Teile in polymeren Materialien mit Hilfe von Abformverfahren gestattet eine sehr kostengünstige Fertigung und damit die Verwendung als Einwegteile.

Geeignete Materialien sind beispielsweise Polymethylmethacrylat (PMMA), Polycarbonate (PC), Cycloolefinische Copolymere (COC), Polyoxymethylen (POM), Polystyrol (PS), Polyurethane oder Silikone. Bei einer Detektion der aufgetrennten Proben über die Fluoreszenzeigenschaften werden als Materialien bevorzugt solche gewählt, die eine niedrige Eigenfluoreszenz aufweisen. Weitere Auswahlkriterien sind eine geringe Wasseraufnahme und Isolierfähigkeit bei den verwendeten hohen elektrischen Spannungen.

Für besondere Anwendungen kann jedoch auch der Einsatz anderer Materialien, wie beispielsweise Glas oder Silizium, für das Substrat und/ oder die Deckplatte in Frage kommen.

Die Deckplatte kann mit dem Substrat unter Einsatz von bei mikrofluidischen Systemen bekannten Klebverfahren verbunden werden. Sind beide Teile Polymerteile, so eignet sich zum Verbinden beispielsweise ein Lösungsmittel

oder Lösungsmittelgemisch, das bezüglich dieser Materialien aufquellende oder anlösende Eigenschaften aufweist.

Nach einer Variante sind die einzelnen Kathoden oder die zusammenhängende Kathodenkanalstruktur und die Anode mit bis zur Ober- oder/ und Unterseite des Elektrophoresechips hindurchgeführten elektrischen Anschlußkontakten verbunden. Nach einer anderen Variante liegen die Anschlußkontakte nicht auf der Ober- oder/ und Unterseite sondern an einer oder mehreren Seiten des Umfangs des Chips.

Das entsprechende Gerät zum Betreiben mindestens eines Elektrophoresechips weist eine Aufnahme- und Haltevorrichtung zur Fixierung der räumlichen Lage des Chips auf. Es sind elektrische Anschlußkontakte vorgesehen, die beim Einlegen des Elektrophoresechips selbsttätig dessen elektrische Kontaktierung bewirken. Weiterhin ist eine nach außen abgeschirmte elektrische Spannungsversorgung vorgesehen. Das Gerät eignet sich besonders zum Betreiben der erfindungsgemäßen Elektrophoresechips. Durch die Trennung von Elektrophoresechip als Wegwerfteil und Betreibereinheit ist es möglich elektrophoretische Trennungen einer großen Anzahl von Proben kostengünstig und mit geringem personellem Aufwand durchzuführen. Darüber hinaus ist auch eine Automatisierung unter Verwendung von Laborrobotern denkbar.

Vorteilhaft ist das Gerät so ausgestaltet, daß zumindest der Detektionsbereich der Trennkanäle von der Oberseite für eine Detektion, beispielsweise im Fluoreszenzmikroskop zugänglich ist. Hierzu ist das Gerät vorteilhaft so flach ausgestaltet, daß dies unter einem Mikroskopobjektiv verwendet werden kann. Besonders vorteilhaft ist in das Gerät zumindest ein Teil eines Systems zur Detektion von in den Trennkanälen des Elektrophoresechips vorliegenden, gegebenenfalls markierten Proben, insbesondere Biomolekülen, integriert.

Nachfolgend werden Ausführungsformen der Erfindung anhand von schematischen Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

- Fig. 1 einen Elektrophoresechip in Draufsicht,
- Fig. 2a einen Ausschnitt des Elektrophoresechips nach Fig. 1 als REM-Aufnahme,
- Fig. 2b einen Ausschnitt der Negativform zur Herstellung des Elektrophoresechips nach Fig. 1 als REM-Aufnahme,
- Fig. 3 den Elektrophoresechip nach Fig. 1 geschnitten von der Seite,
- Fig. 4 eine Deckplatte in Draufsicht,
- Fig. 5 eine Schattenmaske zum Aufdampfen der Elektrodenstrukturen in Draufsicht,
- Fig. 6 ein Gerät zum Betreiben eines Elektrophoresechips mit einem eingelegten Chip nach Fig. 1 in perspektivischer Darstellung geschnitten von der Seite,
- Fig. 7 ein Elektropherogramm erhalten mit einem erfindungsgemäßen Elektrophoresechip.

Die Figur 1 zeigt einen erfindungsgemäßen Elektrophoresechip 1 in Draufsicht von oben. Der Chip 1 besteht aus einer dünnen Platte aus einem polymeren Werkstoff als Substrat 2. Die dargestellten Strukturen sind als Vertiefungen in Form von Nuten in die Oberseite der Platte eingebracht. Die in Kurven verlaufenden Trennkanäle 3a, 3b, ... und die Zwischenkanäle 8a, 8b, ... sind als schwarze Linien dargestellt. Von den Elektrodenkanälen 20a, 20b, ... und 21 sowie von den Kanälen 27, 28 als Pufferreservoir sind nur die Umrisse als schwarze Linien gezeigt.

Die 96 Probenauftragungsbereiche 7a, 7b, ... , die als schwarze Punkte zu erkennen sind, sind matrixartig in 8 Zeilen und 12 Spalten angeordnet. Diese Probenauftragungsbereiche sind über kurze Zwischenkanäle 8a, 8b, ... mit den Kathoden 5a, 5b, ... verbunden. Jeder Probenauftragungsbereich 7a, 7b, ... ist in den Anfang eines Trennkanals 3a, 3b, ... integriert, wobei der Probenauftragungsbereich von einem aufgeweiteten Bereich des Trennkanals 3a, 3b, ... gebildet ist. Die Trennkanäle 3a, 3b, ... sind derart in Schleifen geführt, daß sie eine gleiche Länge und eine gleiche Anzahl von Biegungen aufweisen. Alle Trennkanäle 3a, 3b, ... münden in die Anode 6, wobei in dem vor der Anode liegenden Detektionsbereich die Kanäle parallel zueinander geführt sind.

Die Kathoden 5a, 5b, ... und die Anode 6 sind in das Substrat 2 integriert und sind in Form von Nuten 22a, 22b, ... bzw. 23 als Kathodenkanäle 20a, 20b, ... bzw. als Anodenkanal 21 ausgebildet. Die Nutenböden 24a, 24b, ... und 25 sind mit einem elektrisch leitfähigen Material 26 beschichtet. Jeweils zwei Spalten S1, S2; S3, S4; ... von Probenauftragungsbereichen 7a, 7b, ... sind von jeweils zwei Kathodenkanälen 20a, 20b; 20b, 20c; 20c, 20d; ... seitlich umgeben. Die 7 Kathodenkanäle 20a bis 20g sind oberhalb der obersten Zeile von Probenauftragungsbereichen durch einen quer verlaufenden Kathodenkanal 20h miteinander sowohl elektrisch als auch fluidisch verbunden, so daß eine kammartige Kathodenstruktur vorliegt.

Parallel und oberhalb zum quer verlaufenden Kathodenkanal 20h ist ein als Pufferreservoir dienender Kanal 27 angeordnet, wobei beide im mittleren Bereich miteinander verbunden sind. Analog hierzu ist der Anodenkanal 21 in einem mittleren Bereich mit einem parallel und unterhalb zu diesem angeordneten, als Pufferreservoir dienenden Kanal 28 verbunden.

In einem Ausführungsbeispiel wurde als Substratmaterial PMMA gewählt, wobei der Chip 1 eine Außenabmessung von 61 x 62 x 2 mm aufwies. Die 96 Probenauftragungsbereiche 7a, 7b, ... wurden im Rastermaß einer handelsüblichen 384er Mikrotiterplatte angeordnet, um eine parallele

Übertragung von jeweils 96 Proben zu ermöglichen. Die Trennkanäle 3a, 3b, ... einer einheitlichen Länge von 67 mm wiesen eine Breite und Tiefe von jeweils 50 μm auf. Parallel verlaufende Trennkanäle 3a, 3b, ... waren durch Stege einer Breite von 50 μm voneinander getrennt. Die Radien der Biegungen der Trennkanäle lagen zwischen 360 μm und 500 μm . Die Anzahl der Windungen wurde minimal und für alle Trennkanäle gleich gewählt. Jeder Probenauftragungsbereich 7a, 7b, ... wurde von einem im Anfang des Trennkanals liegenden, aufgeweiteten Bereich gebildet, der einen Durchmesser von etwa 150 μm aufwies. Die Zwischenkanäle 8a, 8b, ... wiesen eine Breite von 100 μm und eine Tiefe von 50 μm auf. Um ein genügend großes Puffervolumen und eine einheitliche elektrische Feldverteilung zu haben, wurden die Elektrodenkanäle 20a, 20b, ..., 21 sowie die als Pufferreservoir dienenden Kanäle 27, 28 mit einer Breite von etwa 3 mm relativ breit gewählt. Die Oberseite des Substrats 2 wurde mit einer 125 μm starken, hier nicht dargestellten PMMA-Folie abgedeckt, die im Bereich der Probenauftragungsbereiche 7a, 7b, ... Löcher aufwies.

Das PMMA-Substrat 2 wurde durch Prägen mikrostrukturiert. Als Prägestempel wurde ein durch galvanische Abformung erhaltener, metallischer Formeinsatz verwendet. Hierzu wurde zunächst ein Siliziumwafer unter Verwendung einer Chrommaske mittels Photolithographie und ASE (Advanced Silicon Etching)-Techniken als Negativ strukturiert. Ausgehend von dieser Negativform wurde durch zweifache galvanische Abformung der Formeinsatz aus Nickel erhalten. Es ist auch denkbar, den Siliziumwafer direkt als Prägestempel zu verwenden, wobei es vorteilhaft ist, den Siliziumwafer hierzu durch Bonden auf einer Glasplatte mechanisch zu stabilisieren. Um eine zweifache galvanische Abformung zu umgehen, kann auch zunächst eine entsprechende Siliziumstruktur im Positiv hergestellt werden und diese anschließend galvanisch abgeformt werden, um einen metallischen Formeinsatz als Negativform zu erhalten.

In Figur 2a ist ein Ausschnitt aus der Figur 1 als Aufnahme in einem Rasterelektronenmikroskop (REM) dargestellt, wobei für entsprechende Teile

die gleichen Bezugszeichen wie in Fig. 1 verwendet sind. Zu erkennen ist ein Trennkanal 3d, der in seinem Anfang zu einem in etwa kreisförmigen Probenaufragungsbereich 7d aufgeweitet ist. Dieser Probenaufragungsbereich ist über den Zwischenkanal 8d mit der Kathode 5a verbunden. Weiterhin ist die Führung der Trennkanäle 3a, 3b, ... in Schleifen zu erkennen, um eine gleiche Länge zu erreichen, bevor die Trennkanäle unmittelbar parallel zueinander geführt werden. Bedingt durch die Darstellung als REM-Aufnahme sind alle Kanäle, einschließlich der Kathodenkanäle 20a, 20b, ... schwarz dargestellt. Des weiteren erscheinen die Kathodenkanäle 20a, 20b, ..., bedingt durch Verzeichnungseffekte, tonnenförmig gewölbt und nicht geradlinig, wie in Fig. 1.

Eine weitere REM-Aufnahme ist in Figur 2b dargestellt. Abgebildet ist ein Ausschnitt der Negativform in Silizium zu Herstellung der in Fig. 2a gezeigten Strukturen. Zum leichteren Vergleich wurden für entsprechende Strukturen als Negativ die gleichen Bezugszeichen wie in Fig. 2a verwendet. Der abgebildete Ausschnitt umfaßt den Probenaufragungsbereich 7d sowie die wegführenden Bereiche des Zwischenkanals 8d und des Trennkanals 3d in Form von Stegen. Deutlich zu erkennen ist die gleiche Höhe dieser drei Strukturen sowie die kreisförmige Ausgestaltung des Probenaufragungsbereichs 7d.

In Figur 3 ist ein Schnitt des in Figur 1 dargestellten Elektrophoresechips 1 entlang der Linie III-III gezeigt, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit keine maßstabsgetreue Darstellung gewählt wurde. Alle Kanäle liegen in Form von Nuten 4a bis 4p, 8a, 8p, 22a, 22b in der Oberseite des Substrats 2 vor. Auf dem Substrat 2 ist eine, in Figur 1 nicht dargestellte Deckplatte 10 als Folie aufgebracht. Im Bereich der Probenaufragungsbereiche 7a und 7p weist die Folie 10 jeweils eine Öffnung 11a, 11p auf. Die Probenaufragungsbereiche 7a und 7p sind über die Zwischenkanäle 8a bzw. 8p mit den Kathodenkanälen 20a bzw. 20b verbunden. Die Kathodenkanäle 20a und 20b weisen auf ihren Nutböden 24a bzw. 24b ein elektrisch leitfähiges Material 26 auf, das als eigentliche Kathode 5a bzw. 5b dient. Im mittleren Bereich sind die parallel zueinander geführten Trennkanäle 3a bis 3p dargestellt.

Figur 4 zeigt eine Deckplatte 10 in Form einer Folie mit 96 Öffnungen 11a, 11b, ... in perspektivischer Darstellung, wobei jeweils 8 Löcher in 12 Spalten S1, S2, ... angeordnet sind. Die Folie 10 weist ober- und unterhalb der Spalten S1, S2, ... jeweils eine Durchgangsöffnung 31a, 31b in Form eines Schlitzes auf. Die Lage dieser Schlitzes 31a, 31b entspricht der Lage der als Pufferreservoir dienenden Kanäle 27, 28 und ermöglicht somit eine Befüllung der Kanäle mit einem Puffer bzw. Gel. Zu den Ecken der Deckplatte 10 hin ist jeweils ein Loch vorgesehen, das Strukturen auf dem Substrat entspricht, und so eine erleichterte Justage beider Teile zueinander ermöglicht. Die Löcher 11a, 11b, ... bzw. die Schlitzes 31a, 31b können durch Laserablatieren, Wasserstrahlschneiden, Bohren, Fräsen oder Stanzen erhalten werden.

In Figur 5 ist eine Schattenmaske 40 in Draufsicht dargestellt, die für das Aufbringen des elektrisch leitfähigen Materials 26 auf die Nutenböden 24a, 24b, ... , 25 der Elektrodenkanäle 20a, 20b, ... 21 sowie der als Pufferreservoir dienenden Kanäle 27, 28 verwendet wird. Hierzu wird diese Maske 40 so über dem Substrat 2 positioniert, daß die zu beschichtenden Nutenböden mit den entsprechenden, als Durchgangsöffnungen 41 ausgebildeten Strukturen der Maske 40 übereinstimmen. Dann wird aus der Gasphase ein elektrisch leitfähiges Material, beispielsweise durch Bedampfen, abgeschieden. Zuerst wird eine 100 nm starke Titan- oder Aluminium-Schicht als Haftvermittler aufgedampft, anschließend wird eine 50 nm starke Gold-Schicht abgelagert. Die Schattenmaske selbst wurde mittels photolithographischer Verfahren unter Einsatz von ASE (Advanced Silicon Etching)-Techniken hergestellt.

In Figur 6 ist ein erfindungsgemäßes Gerät 50 zum Betreiben eines Elektrophoresechips 1 perspektivisch geschnitten von der Seite dargestellt. Das Gerät 50 umfaßt ein nach oben offenes Gehäuse 51, dessen innerer Querschnitt so bemessen ist, daß ein Elektrophoresechip 1 eingelegt werden kann. Im Innern des Gerätes 50 ist eine mit einer elektrischen Zuleitung 55 verbundene Platine 53 vorhanden, wobei zur Stromzuführung auf der Platine 53 elektrische Leiterbahnen 54 zu elektrischen Anschlußkontakten 52a, 52b, 52c in Form von Buchsen führen. Der Elektrophoresechip 1 weist entsprechende

elektrische Anschlußkontakte 30a, 30b, 30c in Form von Stiften auf, so daß beim Einlegen des Chips 1 diese Stifte in die entsprechenden Buchsen der Platine 53 greifen, und so selbsttätig eine elektrische Kontaktierung bewirkt wird. In diesem Beispiel dienen die Buchsen gleichzeitig als Aufnahme- und Haltevorrichtung zur Fixierung der räumlichen Lage des Chips 1. Eine Eingrifföffnung 56 im Gehäuse 51 erleichtert die Entnahme des Chips 1. Die elektrische Spannungsversorgung kann, nach außen abgeschirmt, wie in diesem Beispiel über eine elektrische Zuleitung 55 zugeführt werden oder in dem Gehäuse 51 integriert sein. Mit einer Bauhöhe von nur 21 mm kann das Gerät zur gleichzeitigen Detektion unter einer herkömmlichen Mikroskopanordnung betrieben werden.

In der Figur 7 ist ein mit einem erfindungsgemäßen Elektrophoresechip gemessenes Elektropherogramm dargestellt. Die Abmessungen des verwendeten Probenauftragungsbereichs und des Trennkanals entsprechen denen des zu Figur 1 erläuterten Ausführungsbeispiels. Als Probe wurde eine einzelsträngige DNA einer Länge von 21 Basen mit der Basenabfolge des M13mp21-Primers, markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5, in einer Konzentration von 25 fmol/ μ l aufgegeben. Die Probenzuführung erfolgte über einen Platin-Draht mit einem Durchmesser von 100 μ m, dessen Ende für etwa 5 sec. in die Probenlösung gehalten und dieses anschließend in den Probenauftragungsbereich überführt wurde. Dies entspricht einem überführten Probenvolumen von etwa 150 pl. In den Kanälen und dem Probenauftragungsbereich wurde als Gel 0,75 % Hydroxyethylcellulose (HEC) und 0,5 % Polyvinylpyrrolidon (PVP) in einem Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) vorgegeben. Die Trennung erfolgte über eine Trennstrecke von 6 cm bei einem elektrischen Feld von 400 V/cm. Als Detektionsmethode wurde die konfokale Fluoreszenz-Spektroskopie gewählt, wobei eine Messung der Fluoreszenzlebensdauer nach Anregung bei 635 nm und Detektion mit einer Single-Photon-Avalanche-Diode (SPAD) bei 660 nm erfolgte. Wie deutlich zu erkennen ist, konnte mit dem erfindungsgemäßen Elektrophoresechip, unter Verwendung eines in den Anfang des Trennkanals integrierten Probenauftragungsbereichs, ein mit herkömmlichen Elektrophoresechips

vergleichbares Trennergebnis erzielt werden. Hierdurch kann insbesondere die Verwendung einer Kreuzkanalstruktur als Probenzuführungseinheit und die damit verbundene Auftragung größerer Probenmengen eingespart werden.

Bezugszeichenliste

1	Elektrophoresechip
2	plattenförmiges Substrat
3a, b, ...	Trennkanal
4a, b, ...	Nut
5a, b, ...	Kathode
6	Anode
7a, b, ...	Probenauftragungsbereich
8a, b, ...	Zwischenkanal
10	Deckplatte
11a, b, ...	Öffnungen
20a, b, ...	Kathodenkanal
21	Anodenkanal
22a, b, ...	Nut
23	Nut
24a, b, ...	Nutboden
25	Nutboden
26	elektrisch leitfähiges Material
27	Kanal als Pufferreservoir
28	Kanal als Pufferreservoir
30a, 30b, 30c	elektrischer Anschlußkontakt
31a, 31b	Durchgangsöffnung
40	Schattenmaske
41	Durchgangsöffnung
50	Gerät zum Betreiben eines Elektrophoresechips
51	Gehäuse
52a, 52b, 52c	elektrischer Anschlußkontakt
53	Platine
54	Leiterbahn
55	elektrische Zuleitung
56	Eingrifföffnung
S1, S2, ...	Spalte

Patentansprüche

1. Elektrophoresechip (1) aus einem mit einer Deckplatte (10) versehenen plattenförmigen Substrat (2) mit Trennkanälen (3a, 3b, ...), die in dem Substrat (2) als Nuten (4a, 4b, ...) eingebracht sind, wobei am Anfang der Trennkanäle Kathoden (5a, 5b, ...) und am Ende der Trennkanäle mindestens eine Anode (6) vorgesehen sind, und mit matrixartig in Zeilen und Spalten angeordneten Probenauftragungsbereichen (7a, 7b, ...), an deren Stelle die Deckplatte (10) Öffnungen (11a, 11b, ...) aufweist,

dadurch gekennzeichnet, daß

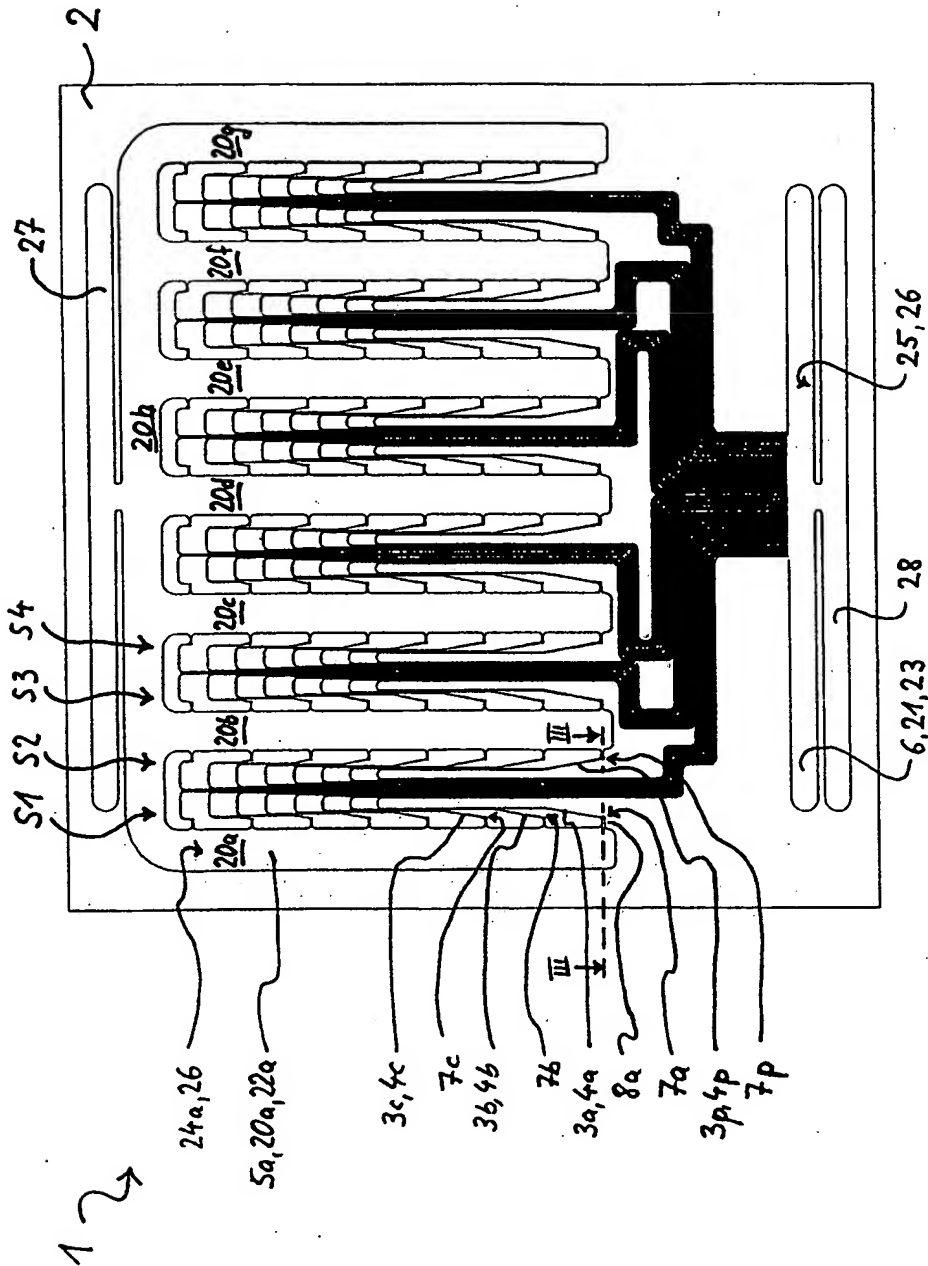
in den Anfang jedes Trennkanals (3a, 3b, ...) genau ein Probenauftragungsbereich (7a, 7b, ...) integriert ist, wobei der Probenauftragungsbereich (7a, 7b, ...) von einem aufgeweiteten Bereich des Trennkanals (3a, 3b, ...) gebildet und über einen Zwischenkanal (8a, 8b, ...) mit einer Kathode (5a, 5b, ...) verbunden ist.

2. Elektrophoresechip (1) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Kathoden (5a, 5b, ...) und die Anode (6) in dem Substrat (2) integriert sind.
3. Elektrophoresechip (1) nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Kathoden (5a, 5b, ...) und/ oder die Anode (6) als Kathodenkanäle (20a, 20b, ...) bzw. Anodenkanal (21) ausgebildet sind, die als Nuten (22a, 22b, ..., 23) in dem Substrat (2) eingebracht sind, deren Nutenböden (24a, 24b, ..., 25) mindestens eine Schicht eines elektrisch leitfähigen Materials (26) aufweisen, wobei die Zwischenkanäle (8a, 8b, ...) in Kathodenkanäle (20a, 20b, ...) bzw. die Trennkanäle (3a, 3b, ...) in den Anodenkanal (21) einmünden.

4. Elektrophoresechip (1) nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die elektrisch leitfähige Schicht (26) als Metallschicht, insbesondere Goldschicht, auf die Nutenböden (24a, 24b, ..., 25), gegebenenfalls mit einer dazwischenliegenden Haftschrift, aufgedampft ist.
5. Elektrophoresechip (1) nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Kathodenkanäle (20a, 20b, ...) elektrisch und fluidisch zusammenhängend ausgebildet sind.
6. Elektrophoresechip (1) nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Kathodenkanäle (20a, 20b, ...) spaltenartig zwischen Spalten (S1, S2, ...) von Probenauftragungsbereichen (7a, 7b, ...) angeordnet sind, wobei jeweils zwei benachbarte Kathodenkanäle (20a, 20b; 20b, 20c; ...) jeweils zwei Spalten (S1, S2; S3, S4; ...) von Probenauftragungsbereichen (7a, 7b, ...) seitlich umgeben, und wobei die Kathodenkanäle (20a, 20b, ...) oberhalb der obersten Zeile von Probenauftragungsbereichen durch einen quer verlaufenden Kathodenkanal (20h) miteinander verbunden sind.
7. Elektrophoresechip (1) nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennkanäle (3a, 3b, ...) parallel zueinander in einen quer hierzu ausgerichteten Anodenkanal (21) einmünden.
8. Elektrophoresechip (1) nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß parallel zum quer verlaufenden Kathodenkanal (20h) und/ oder parallel zum Anodenkanal (21) ein Kanal (27, 28) als Pufferreservoir angeordnet und zumindest in einem mittleren Bereich mit dem Kathodenkanal (20h) bzw. Anodenkanal (21) verbunden ist.

9. Elektrophoresechip (1) nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Kathodenkanäle (20a, 20b, ...), der Anodenkanal (21) und/ oder der Kanal (27, 28) als Pufferreservoir eine Breite > 1 mm aufweisen.
10. Elektrophoresechip (1) nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Kathoden (5a, 5b, ...) und die Anode (6) mit bis zur Ober- oder/ und Unterseite des Elektrophoresechips (1) hindurchgeführten elektrischen Anschlußkontakten (30a, 30b, ...) verbunden sind.
11. Elektrophoresechip (1) nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennkanäle (3a, 3b, ...) zwischen Probenauftragungsbereich (7a, 7b, ...) und Anode (6) derart angeordnet sind, daß sie Krümmungsradien $> 200 \mu\text{m}$, insbesondere zwischen $300 \mu\text{m}$ und $700 \mu\text{m}$, und gleiche Längen aufweisen.
12. Elektrophoresechip (1) nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in den Anfang jedes Trennkanals (3a, 3b, ...) integrierten Probenauftragungsbereiche (7a, 7b, ...) einen Durchmesser von $50 \mu\text{m}$ bis $500 \mu\text{m}$, insbesondere von $80 \mu\text{m}$ bis $300 \mu\text{m}$, und eine Tiefe von $10 \mu\text{m}$ bis $300 \mu\text{m}$, insbesondere eine im wesentlichen gleiche Tiefe wie die Trennkanäle aufweisen.
13. Elektrophoresechip (1) nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat (2) mit den Kanälen ein einstückiges, abformtechnisch hergestelltes Polymerteil und/ oder die Deckplatte (10) eine Polymerfolie ist.

14. Gerät (50) zum Betreiben mindestens eines Elektrophoresechips (1) mit einer Aufnahme- und Haltevorrichtung zur Fixierung der räumlichen Lage des Elektrophoresechips, mit elektrischen Anschlußkontakten (52a, 52b, ...), die beim Einlegen des Elektrophoresechips (1) selbsttätig dessen elektrische Kontaktierung bewirken, und einer nach außen abgeschirmten elektrischen Spannungsversorgung.
15. Gerät nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest ein Teil eines Systems zur Detektion von in den Trennkanälen des Elektrophoresechips vorliegenden, gegebenenfalls markierten Proben integriert ist.



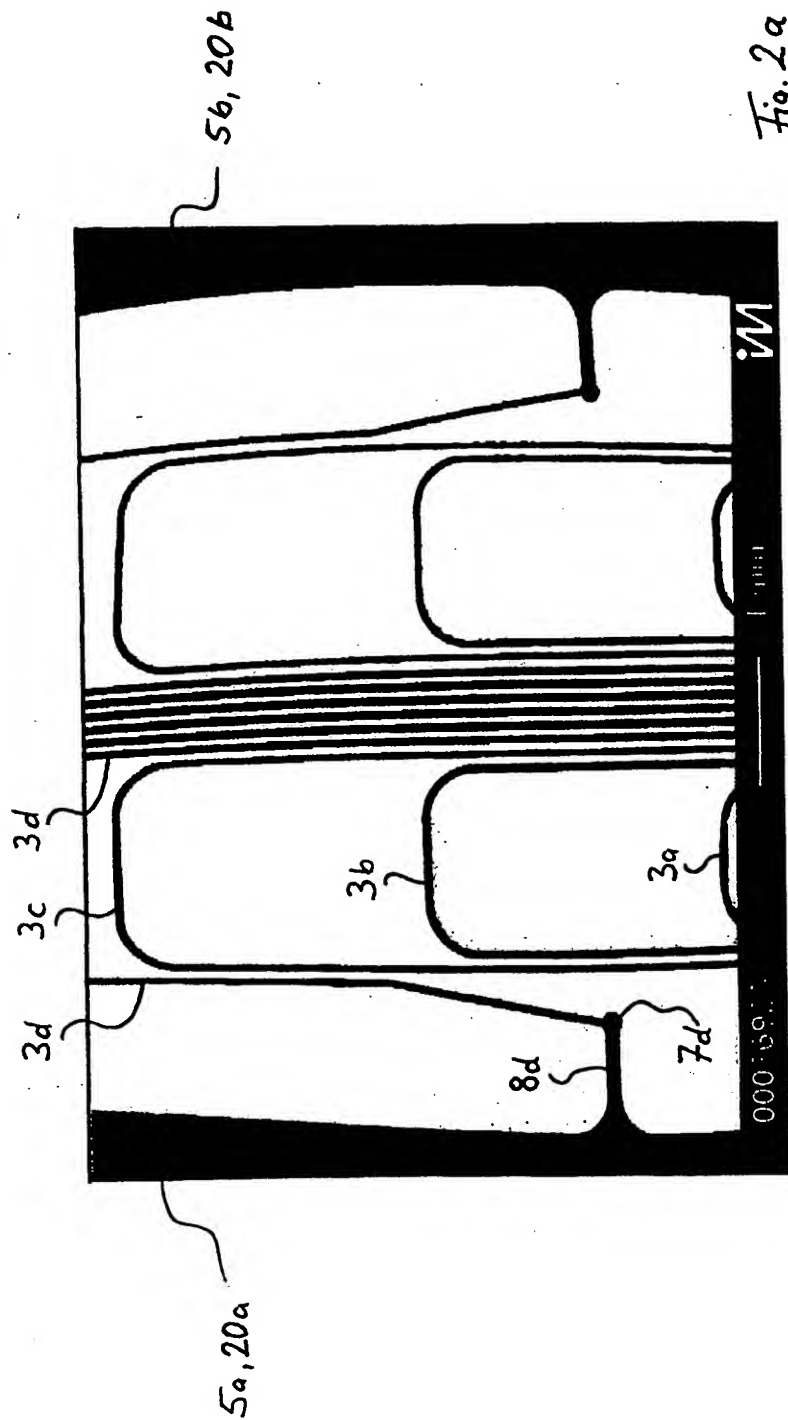


Fig. 2a

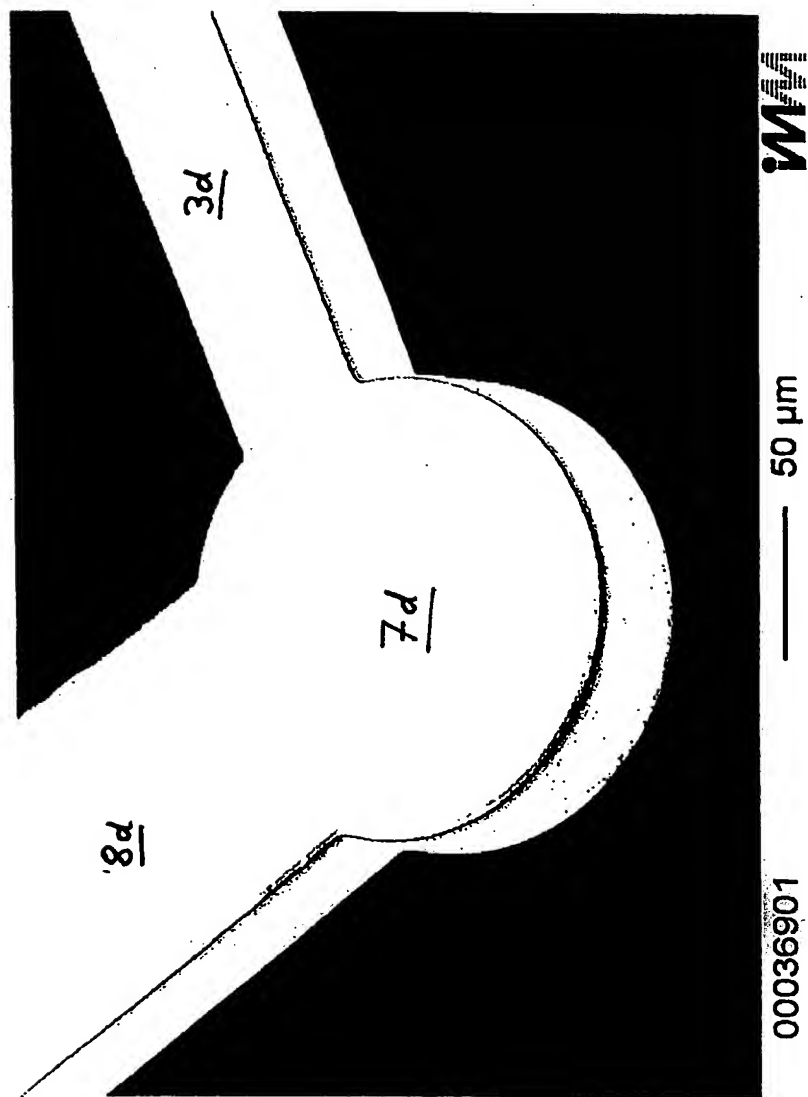


fig. 2b

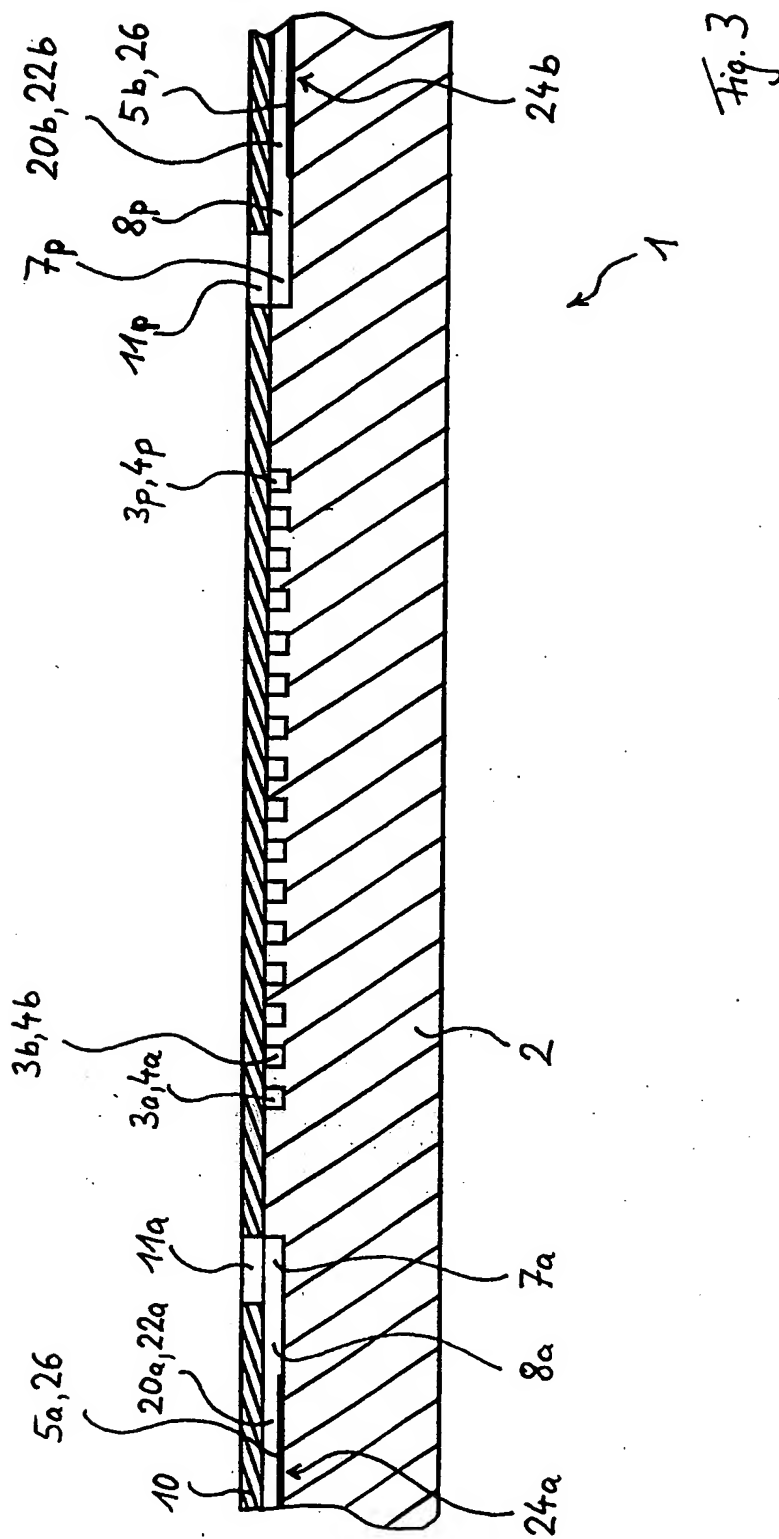


Fig. 4

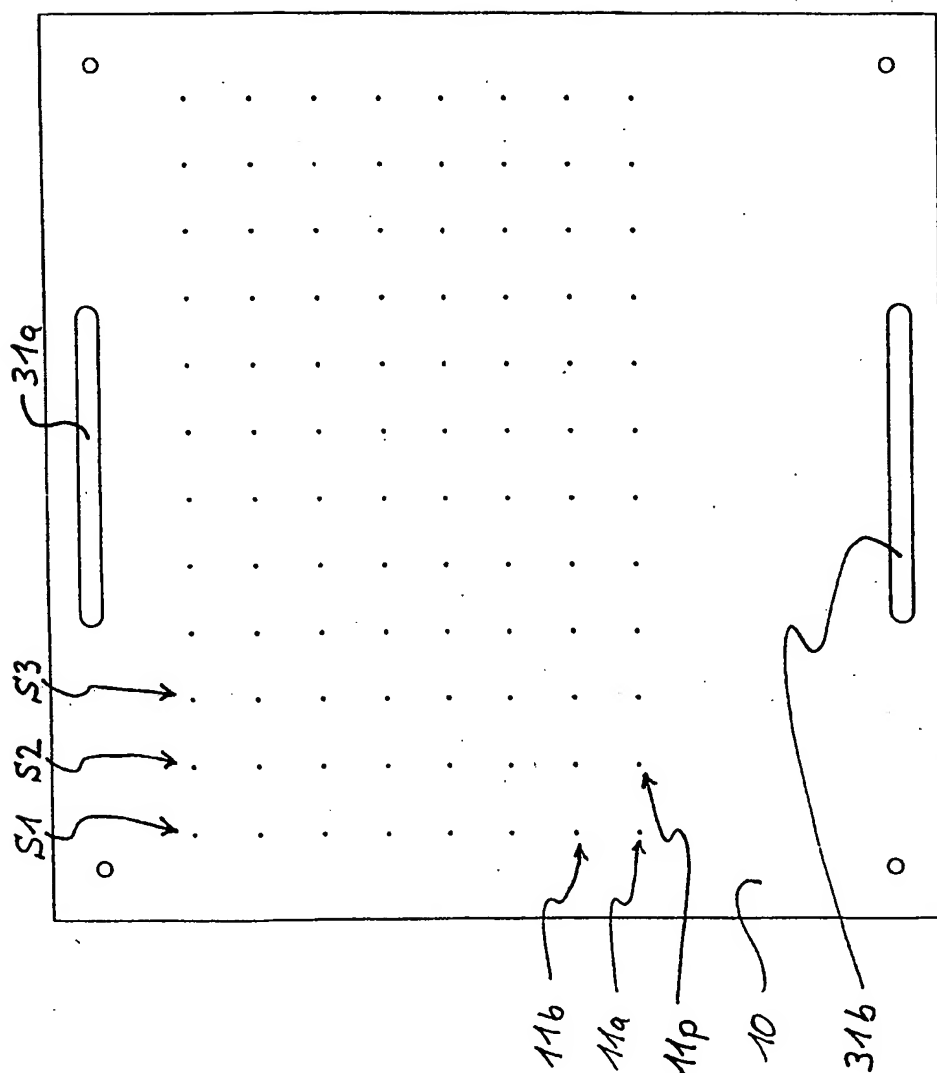
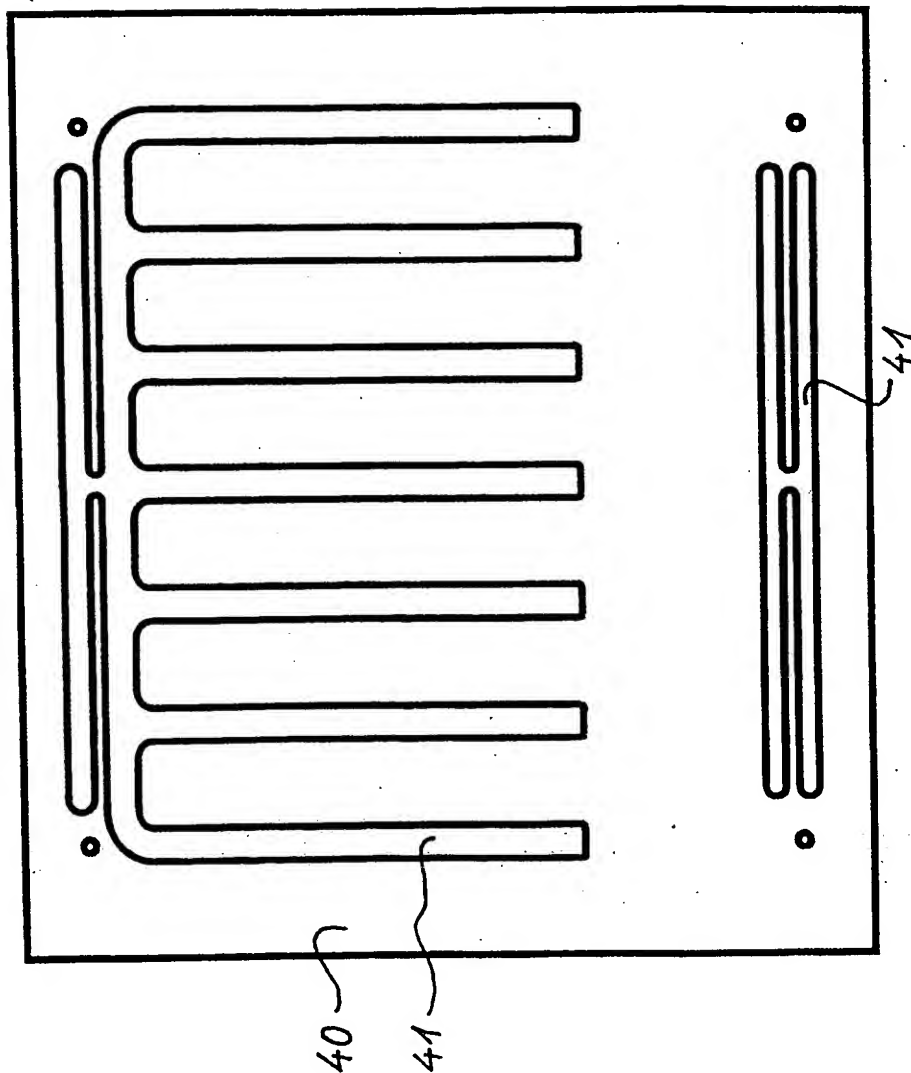


Fig. 5



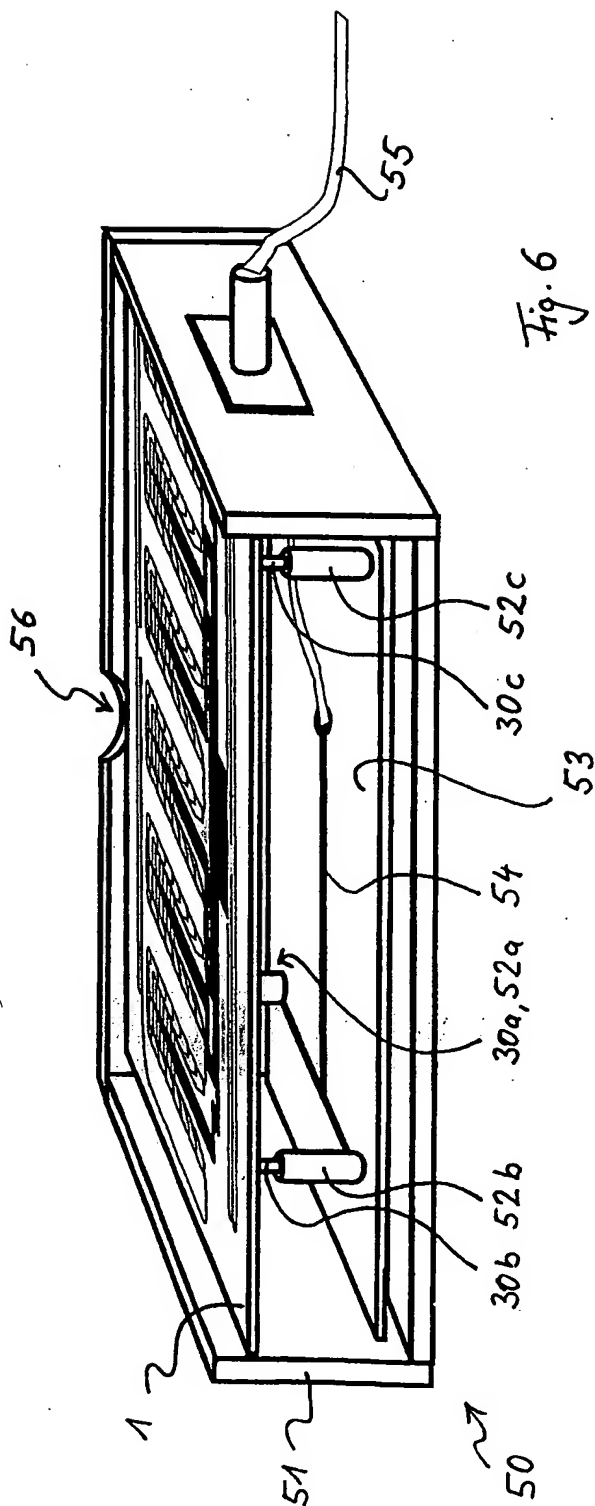
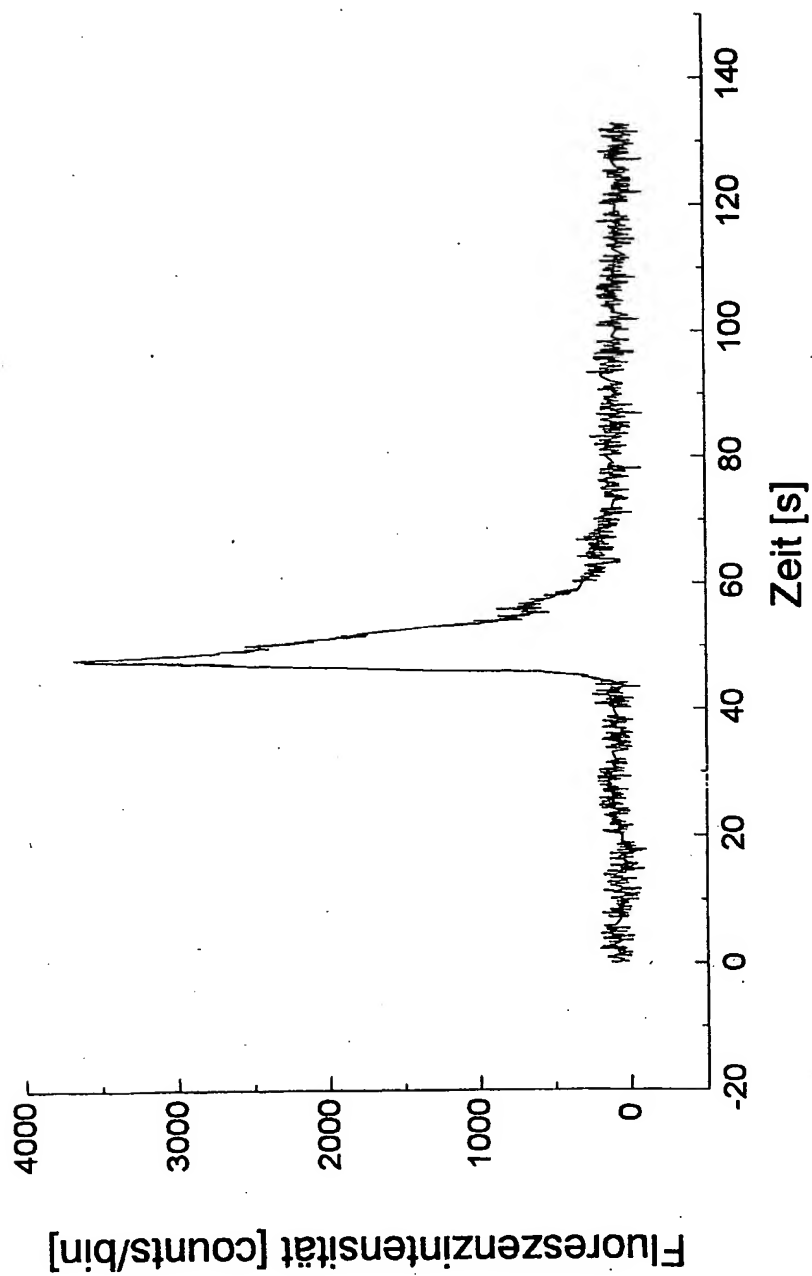


fig. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/02510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 55852 A (SUNDBERG STEVEN A ;CHOW CALVIN Y H (US); PARCE J WALLACE (US); CAL) 10 December 1998 (1998-12-10) page 8, line 34 -page 10, line 33; figures 1-3	1,14
Y	SIMPSON P C ET AL: "HIGH-THROUGHPUT GENETIC ANALYSIS USING MICROFABRICATED 96-SAMPLE CAPILLARY ARRAY ELECTROPHORESIS MICROPLATES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, vol. 95, March 1998 (1998-03), pages 2256-2261, XP000901185 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document	1,14

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 August 2000

Date of mailing of the international search report

25/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Duchatellier, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/02510

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 14368 A (WHITEHEAD BIOMEDICAL INST) 25 March 1999 (1999-03-25) page 21, line 29 -page 24, line 21; figures 1,4,6,7	1
A	WO 99 10735 A (BOUSSE LUC J ;CHOW CALVIN Y H (US); KENNEDY COLIN B (US); PARCE J) 4 March 1999 (1999-03-04) page 12, line 4 -page 14, line 17; figures 1,2A	1
A	WOOLLEY A T ET AL: "HIGH-SPEED DNA GENOTYPING USING MICROFABRICATED CAPILLARY ARRAY ELECTROPHORESIS CHIPS" ANALYTICAL CHEMISTRY,US,AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, vol. 69, no. 11, 1 June 1997 (1997-06-01), pages 2181-2186, XP000696550 ISSN: 0003-2700 figure 1	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/02510

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9855852 A	10-12-1998	AU 7820798 A EP 0988530 A US 6086825 A	21-12-1998 29-03-2000 11-07-2000
WO 9914368 A	25-03-1999	NONE	
WO 9910735 A	04-03-1999	US 5989402 A AU 9205298 A EP 1007954 A	23-11-1999 16-03-1999 14-06-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02510

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N27/447

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 98 55852 A (SUNDBERG STEVEN A ;CHOW CALVIN Y H (US); PARCE J WALLACE (US); CAL) 10. Dezember 1998 (1998-12-10) Seite 8, Zeile 34 -Seite 10, Zeile 33; Abbildungen 1-3	1, 14
Y	SIMPSON P C ET AL: "HIGH-THROUGHPUT GENETIC ANALYSIS USING MICROFABRICATED 96-SAMPLE CAPILLARY ARRAY ELECTROPHORESIS MICROPLATES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 95, März 1998 (1998-03), Seiten 2256-2261, XP000901185 ISSN: 0027-8424 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1, 14
-/--		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung befragt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. August 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Duchatellier, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02510

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 14368 A (WHITEHEAD BIOMEDICAL INST) 25. März 1999 (1999-03-25) Seite 21, Zeile 29 -Seite 24, Zeile 21; Abbildungen 1,4,6,7 -----	1
A	WO 99 10735 A (BOUSSE LUC J ;CHOW CALVIN Y H (US); KENNEDY COLIN B (US); PARCE J) 4. März 1999 (1999-03-04) Seite 12, Zeile 4 -Seite 14, Zeile 17; Abbildungen 1,2A -----	1
A	WOOLLEY A T ET AL: "HIGH-SPEED DNA GENOTYPING USING MICROFABRICATED CAPILLARY ARRAY ELECTROPHORESIS CHIPS" ANALYTICAL CHEMISTRY,US,AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, Bd. 69, Nr. 11, 1. Juni 1997 (1997-06-01), Seiten 2181-2186, XP000696550 ISSN: 0003-2700 Abbildung 1 -----	1

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02510

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9855852 A	10-12-1998	AU 7820798 A EP 0988530 A US 6086825 A	21-12-1998 29-03-2000 11-07-2000
WO 9914368 A	25-03-1999	KEINE	
WO 9910735 A	04-03-1999	US 5989402 A AU 9205298 A EP 1007954 A	23-11-1999 16-03-1999 14-06-2000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.